

LIDIA SZWAJKOWSKA-MICHAŁEK, HANNA KWAŚNA, JULIUSZ PERKOWSKI

Oznaczanie biomasy grzybni w glebie metodą analizy zawartości ergosterolu

Determination of fungal biomass in soil using ergosterol content analysis

ABSTRACT

Szwajkowska-Michałek L., Kwaśna H., Perkowski J. 2014. Oznaczanie biomasy grzybni w glebie metodą analizy zawartości ergosterolu. Sylwan 158 (3): 203-211.

The presence of microorganisms in the substrate is detected with increasing frequency using chemical methods. During the first 9 weeks ergosterol concentration in sterile or not sterile soil inoculated with one of the damping-off fungi reached 966 µg/g, while number of colony forming units (cfu) went up to 247×10^3 cfu/g. Ergosterol concentration was correlated with the size of the soil fungal community estimated in terms of the number of colony forming units in soil. Pearson's correlation coefficient was 0.700-0.946 for sterile and not sterile soil. Higher content of ergosterol was observed for *F. sambucinum* var. *sambucinum*, *H. haematococca* and *T. cucumeris* while higher average content of cfu was observed for *H. haematococca* and *T. cucumeris*.

KEY WORDS

ergosterol, microbiological and chemical analysis of soil, damping-off fungi

ADDRESSES

Lidia Szwajkowska-Michałek ⁽¹⁾ – e-mail: lidiasz17@wp.pl

Hanna Kwaśna ⁽²⁾ – e-mail: kwasna@up.poznan.pl

Juliusz Perkowski ⁽¹⁾ – e-mail: julperk@up.poznan.pl

⁽¹⁾ Katedra Chemii; Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu; ul. Wojska Polskiego 75; 60-637 Poznań

⁽²⁾ Zakład Fitopatologii Leśnej; Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu; ul. Wojska Polskiego 71 C; 60-637 Poznań

Wstęp

Do podstawowych metod określania struktury zbiorowiska mikroorganizmów w glebie należą metody mikrobiologiczne. Opierają się one m.in. na izolacji mikroorganizmów na podłożach mikrobiologicznych, liczeniu kolonii wyrosłych z jednostek tworzących kolonie (u grzybów z zarodników lub fragmentów strzępek) w objętości gleby oraz ocenie morfologicznej (podobieństwo fenotypowe) lub molekularnej (pokrewieństwo) wyrosłych kultur [Mańka 1974]. Coraz częściej obecność mikroorganizmów w podłożu stwierdza się metodami chemicznymi. Opierają się one na analizie związków wchodzących w skład mikroorganizmów. Jednym z nich jest ergosterol. Ergosterol jest głównym steroidem grzybów [Newell 1992]. Niewielkie ilości ergosterolu znajdują się również u glonów jednokomórkowych, pierwotniaków i niektórych bakterii [Weete 1989; Zhao i in. 2005]. Ergosterol uczestniczy w budowie i funkcjonowaniu błony cytoplazmatycznej komórek i błon mitochondriów w grzybni wegetatywnej i zarodnikach. Decyduje o integralności błon. Jego zawartość wpływa na intensywność oddychania grzybów [Sundberg i in. 1999].

Oznaczanie zawartości ergosterolu zastosowali po raz pierwszy Seitz i in. [1977]. Metodą wysokosprawnej, ciśnieniowej chromatografii cieczonej (HPLC) badali zawartość ergosterolu w ziarnie zbóż zasiedlonym przez grzyby. Metodę zastosowano do badania biomasy grzybów

[Gessner, Newell 1997; Montgomery i in. 2000; Ruzicka i in. 2000] oraz zanieczyszczenia mikrobiologicznego zbóż, produktów spożywczych, materiałów budowlanych i powietrza [Grant, West 1986; Johnson, McGill 1990a, b; Müller, Schwadorf 1993; Gutarowska, Żakowska 2002; Lau i in. 2006].

Celem pracy było wyznaczenie zawartości biomasy grzybowej w leśnej glebie szkółkowej w różnym okresie po inokulacji grzybami zgorzelowymi. Podjęto również próbę korelacji wyników dwóch metod badania zasiedlenia gleby przez grzyby. Pierwszą była mikrobiologiczna analiza gleby przeprowadzona tradycyjną metodą izolacji grzybów na pożywce, drugą natomiast chemiczna analiza gleby przeprowadzona metodą badania zawartości ergosterolu.

Materiały i metody

GLEBA. Do badań użyto niesterylnej i sterylnej leśnej gleby szkółkowej inokulowanej jednym z następujących grzybów zgorzelowych: *F. oxysporum*, *F. sambucinum* var. *sambucinum* Fuckel, *Haematonectria haematococca* (Berk. & Broome) Samuels & Rossman, *Neonectria radicola* (Gerlach & L. Nilsson) Mantiri & Samuels i *Thanatephorus cucumeris* (A.B. Frank) Donk i podlewanej płynem pochodzonym *Penicillium adametzii* Zaleski. Gleba pochodziła ze szkółki leśnej z Wielkopolski (Garncarski Bród, Nadleśnictwo Oborniki Wlkp.). Jej odczyn wynosił 3,5 w skali pH. Sterylizację gleby wykonano 7 dni przed inokulacją grzybami zgorzelowymi, dwukrotnie w odstępach 24 godz., każdorazowo przez 2 godz. w temperaturze 121°C.

MIKROBIOLOGICZNA IZOLACJA GRZYBÓW. Izolację grzybów przeprowadzono metodą rozcieńczenia próbki gleby [Johnson, Mańka 1961; Mańka 1964]. 1 g gleby łączono ze 149 g sterylnego piasku kwarcowego w kolbie. 27 mm³ mieszaniny glebowo-piaskowej umieszczano w sterylnej płytce Petriego. Zalewano ją schłodzoną do 50°C pożywką Martina-Johnsona (pepton 5,0 g, KH₂PO₄ 1,0 g, MgSO₄·7 H₂O 0,5 g, glukoza 10 g, róż bengalski 0,03 g, aureomycyna 0,0025 g, agar 20 g, woda destylowana do 1 l) [Martin 1950; Johnson 1957]. Grzyby inkubowano w temperaturze 25°C przez 7 dni. Liczbę izolatów określono po zliczeniu kolonii grzybowych. Izolację grzybów z gleby niesterylnej i sterylnej wykonano odpowiednio 9- i 8-krotnie, w odstępach tygodniowych; każdorazowo w 10 powtórzeniach. Wyliczono liczbę jednostek tworzących kolonie (jtk) w 1 g gleby.

CHEMICZNE OZNACZANIE ERGOSTEROLU. Ekstrakcję ergosterolu przeprowadzono, wykorzystując metodę Perkowskiego i in. [2008]. Do 0,2 g gleby dodano 0,5 ml 2M NaOH i 2 ml metanolu (CH₃OH). Dla ułatwienia saponifikacji (zmydlania) i początkowej ekstrakcji metanolem próbę podgrzewano promieniami mikrofalowymi (370 W, 2×20 s.). Następnie próbę chłodzono i neutralizowano 1M HCl i 2 ml CH₃OH, po czym kontynuowano ekstrakcję ergosterolu przy użyciu pentanu (C₅H₁₂, 4 ml, 3×5 min). Warstwy pentanowe połączono i odparowano w strumieniu azotu. Analizę chemiczną prowadzono metodą wysokosprawnej, ciśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC). Rozdział chromatograficzny prowadzono na kolumnie Nova Pack z fazą związaną oktadecylołą C-18, z fazą wymywającą acetonitryl/metanol w stosunku 9:10 (v/v), przy przepływie 0,6 ml/min. Detekcję ergosterolu prowadzono w detektorze absorpcji światła nadfioletowego i widzialnego przy długości fali λ=282 nm (Waters 486 Tunable Absorbance Detector). Odzysk ergosterolu wynosił 97%, a poziom wykrywalności 0,02 µg/g.

ANALIZA SATYSTYCZNA. W celu określenia korelacji liniowej między liczbą jednostek tworzących kolonie grzybowe w 1 g gleby a zawartością ergosterolu w 1 g gleby wyznaczono wartości współczynnika korelacji Pearsona z uwzględnieniem poziomu istotności p<0,05 i p<0,001, stosując program Statistica 6.0. Wykresy przedstawiające liczbę jednostek tworzących kolonie i zawartość

ergosterolu w glebie sterylnej i niesterylnej innokulowanej jednym z grzybów zgorzelowych sporządzono na podstawie obserwacji trwającej 9 tygodni, wybierając 2., 5. i 9. tydzień jako znaczące punkty obrazujące przebieg doświadczenia.

Wyniki

Zawartość ergosterolu w glebie inokulowanej grzybami zgorzelowymi, w okresie do 9 tygodni, wynosiła od 0 do 966 $\mu\text{g/g}$, a liczba jednostek tworzących kolonie $0\text{-}247 \times 10^3$ jtk/g (ryc.). W okresie badań zawartość ergosterolu oraz liczba jtk zaczynała rosnąć w 3. tygodniu, osiągając maksimum w 5. tygodniu, natomiast w ostatnim tygodniu obserwowano spadek wartości zarówno ergosterolu, jak i jtk. Jedynie w przypadku *Fusarium oxysporum* zawartość ergosterolu w glebie niesterylnej osiągnęła wartość maksymalną w 9. tygodniu obserwacji. W glebie niesterylnej zawartość ergosterolu obserwowano na poziomie 13,97-56,16 $\mu\text{g/g}$. W glebie sterylnej zawartość ergosterolu osiągnęła wyjątkowo wysokie wartości (362,4 $\mu\text{g/g}$ w 5. tygodniu dla *F. sambucinum* var. *sambucinum*, 966 $\mu\text{g/g}$ w 5. tygodniu dla *H. haematococca* i 309 $\mu\text{g/g}$ w 5. tygodniu dla *T. cucumeris*). W glebie niesterylnej zawartość jtk kształtowała się na poziomie $2,65 \times 10^3\text{-}61,4 \times 10^3$ jtk/g. Najwyższą średnią zawartość jtk dla gleby sterylnej obserwowano dla *H. haematococca* (247×10^3 jtk/g w 5. tygodniu), *Fusarium oxysporum* (190×10^3 jtk/g w 5. tygodniu) i *T. cucumeris* (155×10^3 jtk/g w 5. tygodniu) (ryc.). Współczynnik korelacji Pearsona przyjmował wartości 0,744-0,946 dla gleby niesterylnej i 0,700-0,900 dla gleby sterylnej (tab.).

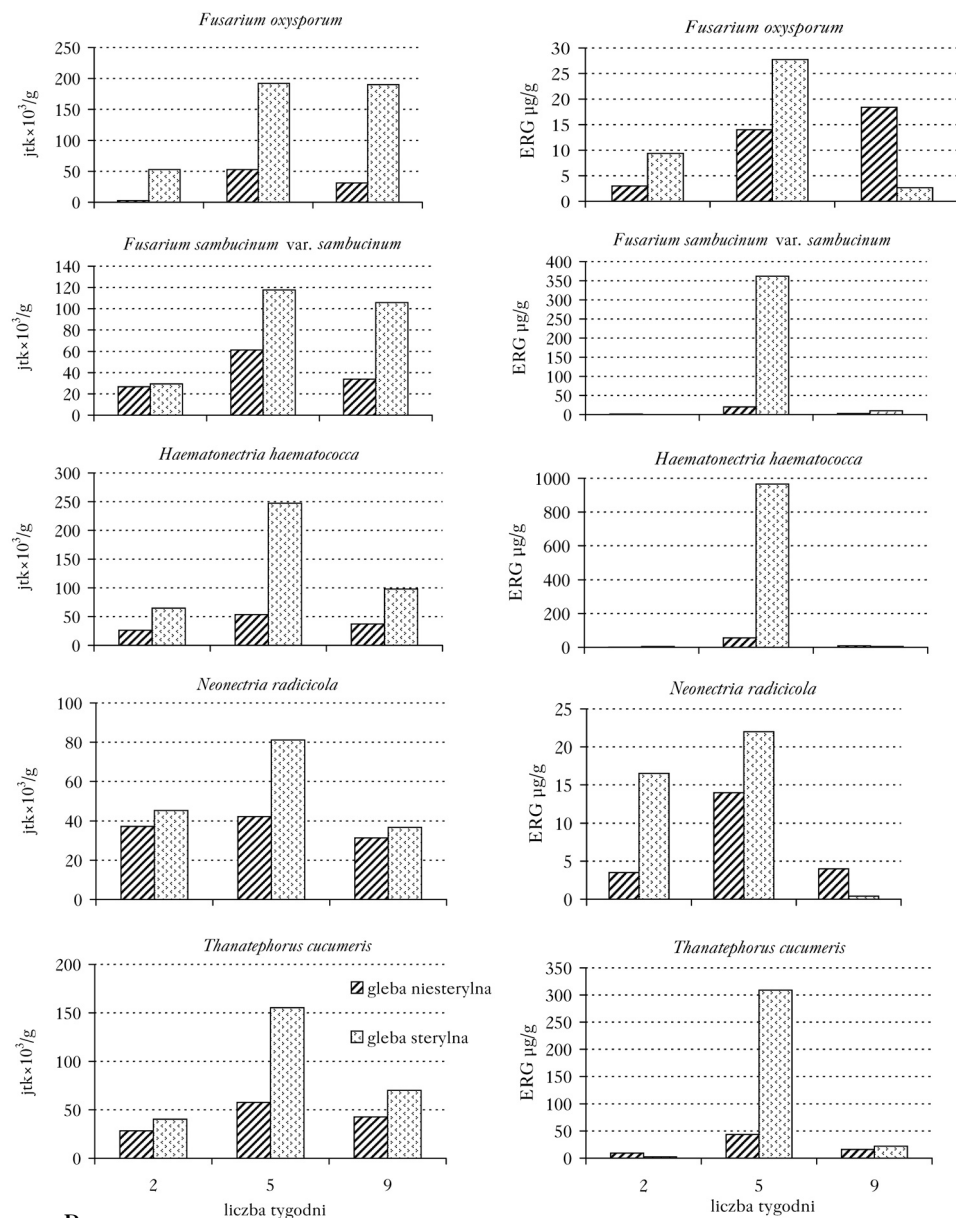
Dyskusja

Z uwagi na obecność ergosterolu w ścianach komórkowych grzybów przyjmuje się, że zawartość tego związku w glebie jest skorelowana z wielkością biomasy grzybów [Marfleet i in. 1991; Schnürer, Jonsson 1992; de Castro i in. 2002; Gutarowska, Żakowska 2002]. Niniejsze badania prezentują relacje między zawartością ergosterolu i biomasy grzybowej w glebie. Zaobserwowano wyraźną korelację między zawartością ergosterolu w glebie i wielkością populacji grzybów wyrażoną liczbą jednostek tworzących kolonie. Współczynnik korelacji wyniósł 0,700-0,946 i był zbliżony do wartości (0,950) stwierdzonej przez Barajas-Aceves i in. [2002] i Montgomery i in. [2000]. W prezentowanych badaniach współczynnik korelacji był na ogół wyższy dla gleby niesterylnej, co stoi w sprzeczności z wynikami Barajas-Aceves i in. [2002], którzy nie stwierdzili wyraźnej korelacji między zawartością ergosterolu i biomasą C w glebie niesterylnej. Brak korelacji tłumaczyli obecnością w glebie innych, pozagrzybnowych mikroorganizmów posiadających ergosterol.

Zawartość ergosterolu w glebie zależy nie tylko od wielkości biomasy grzybów, ale także od fizycznych i chemicznych warunków środowiska: m.in. struktury, temperatury, wilgotności, odczynu, zawartości tlenu i składników pokarmowych, charakteru zawartych związków [Seitz i in. 1979; Newell i in. 1987; Salmonowicz, Nylunda 1988; Schnürer 1993; Newell 1994; Montgomery i in. 2000; Nielsen, Madsen 2000; Dawson-Andoh 2002]. Nie bez znaczenia jest obecność niszy ekologicznych preferujących okresowy i lokalny rozwój określonych grup grzybów. Średnio przyjmuje się jednak obecność 4-5 μg ergosterolu w 1 mg biomasy grzybów glebowych [Montgomery i in. 2000; Ruzicka i in. 2000; Eiland i in. 2001].

W badanej leśnej, niesterylnej glebie szkółkowej stwierdzano bardziej stabilną zawartość ergosterolu w czasie niż w glebie sterylnej. Po 3. tygodniu nastąpił wzrost zawartości ergosterolu w wyniku wzrostu populacji grzybów stymulowanych metabolitami *P. adametzii* dodawanymi do gleby. W 3.-5. tygodniu średnia zawartość ergosterolu w glebie niesterylnej wynosiła 13,97-56,16 $\mu\text{g/g}$. Zawartość ergosterolu była wyższa lub mieściła się w granicach obserwowanych w glebach

leśnych przez innych badaczy: m.in. 5,45 $\mu\text{g/g}$ gleby z terenu Niemiec [Djajakirana i in. 1996], 2,36 $\mu\text{g/g}$ gleby z południowych terenów USA [Stahl, Perkin 1996], 30,8-34,4 $\mu\text{g/g}$ i 25,6-85,9 $\mu\text{g/g}$ gleby z lasów sosnowych [Ohtonen, Vare 1998; de Ridder-Duine i in. 2006]. Według Westa i in. [1987a], Scheua i Parkinsona [1994] oraz Ruzicki i in. [2000] zawartość ergosterolu w glebie wynosi 0,08-230 $\mu\text{g/g}$ gleby. Różnice mogą wynikać z zastosowania różnych metod ekstrakcji.



Ryc.

Liczba jednostek tworzących kolonie i zawartość ergosterolu w ciągu 9 tygodni w glebie sterylnej i niesterylnej innokulowanej jednym z grzybów zgorzelowych

Number of colony forming units and ergosterol content within 9 weeks in soil sterile and non-sterile inoculated with one of the damping-off fungi

Tabela.

Wartości współczynnika korelacji Pearsona między liczbą jednostek tworzących kolonie i zawartością ergosterolu w glebie sterylnej i niesterylnej innokulowanej jednym z grzybów zgorzelowych

Pearson correlation coefficients between the number of colony forming units and the content of ergosterol in non-sterile and sterile soil inoculated with one of the damping-off fungi

Grzyb	Gleba niesterylna	Gleba sterylna
<i>Neonectria radicola</i>	0,744**	0,848**
<i>Fusarium oxysporum</i>	0,894**	0,900*
<i>Fusarium sambucinum</i> var. <i>sambucinum</i>	0,913*	0,831**
<i>Haematonectria haematococca</i>	0,946*	0,700**
<i>Thanatephorus cucumeris</i>	0,943*	0,888**

*p<0,001; **p<0,05

W niniejszych badaniach zastosowano ekstrakcję w środowisku alkalicznym, co, jak podają Davis i Lamar [1992], zwiększa dokładność analizy.

Dla gleb najczęściej podaje się korelację między zawartością ergosterolu ($\mu\text{g/g}$) i zawartością suchej masy grzybni (mg/g). West i in. [1987a, b] oraz Stahl i Parkin [1996] podają korelację między zawartością ergosterolu i powierzchnią strzępek (0,16 μg ergosterolu w 1 cm^2 grzybni) i długością strzępek (w 1 g gleby, 1-3,5 μg ergosterolu odpowiadało 100-1 270 m wszystkich strzępek i 20-250 m żywych strzępek, współczynnik korelacji wynosił 0,638-0,874). Korelację między zawartością ergosterolu w μg i liczbą jednostek tworzących kolonie w 1 g ziarna zbóż stwierdzili Marfleet i in. [1991], Schnürer i Jonsson [1992], Tothill i in. [1992] oraz de Castro i in. [2002]. Współczynnik korelacji wynosił odpowiednio 0,91-0,95 i 0,72-0,88. U Gawrysiak-Witulskiej i in. [2008] zawartość ergosterolu w ziarnie zbóż wynosiła 0,92-10,87 $\mu\text{g/g}$, liczba jtk 7000-43000/g, współczynnik korelacji $r=0,92$. W badaniach zanieczyszczenia mikrobiologicznego środowiska tylko Gutarowska i Żakowska [2002] podają korelację między zawartością ergosterolu i liczbą jednostek tworzących kolonie na powierzchni materiałów budowlanych. Zawartość ergosterolu $>3,96 \text{ mg/m}^2$ powierzchni odpowiadała obecności 1000-100 000 000 jtk/ m^2 , a współczynnik korelacji wynosił 0,790-0,933.

Newell i in. [1987] oraz Ekblad i in. [1998] obserwowali spadek zawartości ergosterolu zarówno po autolizie strzępek grzybów, jak i w starzejących się mikoryzach. Ekblad i in. [1998] przypisali to degradacji ergosterolu w zamierających lub w martwych strzępkach. Obie obserwacje przyczyniły się do powstania opinii, że ergosterol ulega szybkiej degradacji po śmierci grzybów, a badanie zawartości ergosterolu może służyć do badania wielkości żywej biomasy grzybów [Seitz i in. 1979; West i in. 1987a; Scheu, Parkinson 1994]. Okazuje się jednak, że ergosterol ulega szybkiej degradacji, ale tylko na świetle (43% w ciągu 24 godz. [Mille-Lindblom i in. 2004]). Przy braku światła degradacja przebiega znacznie wolniej (34% w ciągu 2 miesięcy).

Mille-Lindblom i in. [2004] zasugerowali możliwości rozkładu ergosterolu pod wpływem wysokiej temperatury. Kadakal i Artik [2008] podają, że temperatura 70-95°C, zwłaszcza przy niższym pH podłoża, przyspiesza degradację ergosterolu w paście pomidorowej. Newell i in. [1987] zaobserwowali, że wysoka temperatura rozkłada ergosterol, ale tylko na świetle. W niniejszych badaniach obserwowano podobną, początkową zawartość ergosterolu w glebie niesterylnej i wysterylizowanej poprzez autoklawowanie. Wydaje się, że zastosowana temperatura autoklawowania (121°C) nie rozłożyła ergosterolu grzybów, pomimo że denaturowała białko, powodując zamarcie żywej biomasy grzybów. Uzyskany wynik sugeruje małą podatność ergosterolu zawartego w glebie na rozkład pod wpływem temperatury powyżej 100°C. Można przypuszczać,

że duża odporność ergosterolu na wysoką temperaturę wynika z denaturacji enzymów uczestniczących w rozkładzie ergosterolu. Wynik ten stoi w sprzeczności z wynikami Barajas-Aceves i in. [2002], którzy w glebie nieautoklawowanej stwierdzili 2-4 razy mniej ergosterolu niż w glebie autoklawowanej.

Analiza mikrobiologiczna oparta na liczeniu jednostek tworzących kolonie uwzględnia kolonie wyrastające tylko z żywych komórek grzybów. Analiza chemiczna oparta na badaniu zawartości ergosterolu stwierdza natomiast ergosterol zarówno w żywych, jak i martwych strzępkach. Stosunek długości wszystkich strzępek do żywych strzępek grzybów w glebie zdaniem Stahla i Parkina [1996] wynosi (4-):5:1. Wnioskowanie na temat wielkości biomasy grzybów w glebie na podstawie liczby jednostek tworzących kolonie powinno więc uwzględniać podany powyżej stosunek. Należy również uwzględnić fakt, że zastosowana analiza mikrobiologiczna często nie stwierdza obecności podstawczaków, uśpionych endofitów, jak również gatunków, które nie rosną lub rosną wolno na podłożach sztucznych [Kwaśna i in. 2008].

Analiza zawartości ergosterolu jest bardzo obiecującą metodą badania biomasy grzybnii w glebie. Wynika to ze specyfiki występowania ergosterolu, jego stosunkowo dużej odporności na rozkład w glebie [Mille-Lindblom i in. 2004], dużej odporności na działanie innych mikroorganizmów, jak również stosunkowo prostej techniki analizy. Jest to dobra metoda do badań obecności grzybów w glebie i reakcji grzybów na zabiegi agrotechniczne, stosowane nawozy i środki chemiczne. Zawartość ergosterolu w glebie nie zależy od zanieczyszczenia gleby metalami ciężkimi i niektórymi fungicydami [Barajas-Aceves i in. 2002], dlatego metoda ta może być stosowana dla badań mikrobiologicznych gleb zanieczyszczonych, zwłaszcza monitorowania procesu bioremediacji. Bardziej stabilna zawartość ergosterolu w glebie niesterylnej oznacza, że metoda może być bardziej przydatna dla badania środowisk zrównoważonych i mniej dynamicznych, może posłużyć także do monitorowania populacji grzybów w podłożach szkółkarskich. Niestety, nie pozwala ona identyfikować grzybów, a jedynie potwierdzać ich obecność czy też rejestrować zmiany w ich liczebności. Nie ma zatem możliwości różnicowania jakościowego pod względem składu gatunkowego grzybów występujących w podłożu. Oznaczanie ergosterolu znalazło również zastosowanie do oceny intensywności kolonizacji mykoryzowej siewek w warunkach nie tylko laboratoryjnych, ale także polowych, jako alternatywa dla pracochłonnych metod tradycyjnych [Salmonowicz, Nylunda 1988; Wallander i in. 1997].

Podsumowanie

Zawartość ergosterolu w sterylnej i niesterylnej glebie inokulowanej grzybami zgorzelowymi (*F. oxysporum*, *F. sambucinum* var. *sambucinum*, *Haematonectria haematococca*, *Neonectria radicola* i *Thanatephorus cucumeris*) w 1.-9. tygodniu wynosiła 0-966 µg/g. Zaczynała ona wzrastać w 3. tygodniu i osiągała większe wartości w 4.-6. tygodniu. Wzrost zawartości ergosterolu świadczy o wzroście populacji grzybów zgorzelowych, które w tym czasie u siewek powodują zgorzel powschodową. Okresowo, tylko w glebie sterylnej, osiągnęła wyjątkowo wysokie wartości. Najwyższą średnią zawartość jtk obserwowano dla *H. haematococca* (247×10^3 jtk/g w 5. tygodniu). Zawartość ergosterolu w glebie była skorelowana z wielkością populacji badanych grzybów wyrażoną liczbą jednostek tworzących kolonie w 1 g gleby. Współczynnik korelacji Pearsona wynosił odpowiednio 0,700-0,946. Wysokie wartości współczynnika korelacji świadczą o istotnej korelacji wielkości populacji badanych grzybów z zawartością ergosterolu. Wydaje się zatem, że metoda oznaczania zawartości ergosterolu jest skuteczna nie tylko do stwierdzenia obecności grzybów, ale również stopnia zasiedlenia podłoża przez grzyby. W podłożu szkółkarskim metoda ta może posłużyć do monitorowania przebiegu zgorzeli powschodowej siewek.

Literatura

- Barajas-Aceves M., Hassan M., Tinoco R., Vazquez-Duhalt R. 2002. Effect of pollutants on the ergosterol content as indicator of fungal biomass. *Journal of Microbiological Methods* 50: 227-236.
- de Castro M. F. P. M., Bragagnolo N., de Toledo Valentini S. R. 2002. The relationship between fungi growth and aflatoxin production with ergosterol content of corn grains. *Brazilian Journal of Microbiology* 33 (1): 22-26.
- Davis M. W., Lamar R. T. 1992. Evaluation of methods to extract ergosterol for quantification of soil fungal biomass. *Soil Biology and Biochemistry* 24: 189-198.
- Dawson-Andoh B. E. 2002. Ergosterol content as a measure of biomass of potential biological control fungi in liquid cultures. *Holz als Roh- und Werkstoff* 2: 115-117.
- Djajakirana G., Joergensen R. G., Meyer B. 1996. Ergosterol and microbial biomass relationship in soil. *Biology and Fertility of Soils* 22: 299-304.
- Eiland F., Klammer M., Lind A.-M., Leth M., Bääth E. 2001. Influence of initial C/N ratio on chemical and microbial composition during long term composting of straw. *Microbial Ecology* 41: 272-280.
- Ekblad A., Wallander H., Näsholm T. 1998. Chitin and ergosterol combined to measure total and living fungal biomass in ectomycorrhizas. *New Phytologist* 138: 143-149.
- Gawrysiak-Witulska M., Wawrzyniak J., Ryniecki A., Perkowski J. 2008. Relationship of ergosterol content and fungal contamination and assessment of technological quality of malting barley preserved in a metal silo using the near-ambient method. *Journal of Stored Products Research* 44 (4): 360-365.
- Gessner M. O., Newell S. Y. 1997. Bulk quantitative methods for the examination of eucaryotic organoosmotrophs in plant litter. W: Hurst M. O., Knudsen G. R., McInerney M. J., Stetzenbach L. D., Walter M. V. [red.]. *Manual of Environmental Microbiology*, American Society for Microbiology, Washington. 295-308.
- Grant W. D., West A. W. 1986. Measurement of ergosterol, diaminopimelic acid and glucosamine in soil: evaluation as indicators of microbial biomass. *Journal of Microbiological Methods* 6: 47-53.
- Gutarowska B., Żakowska Z. 2002. Elaboration and application of mathematic model for estimation for mould contamination of some building materials based on ergosterol content determination. *International Biodeterioration and Biodegradation* 49: 299-305.
- Johnson B. N., McGill W. B. 1990a. Comparison of ergosterol and chitin as quantitative estimates of mycorrhizal infection and *Pinus contorta* seedling response to inoculation. *European Food Research and Technology* 20: 1125-1131.
- Johnson B. N., McGill W. B. 1990b. Variation in ergosterol content and ornithine decarboxylase activity of ectomycorrhizal root-soil systems. *Plant Soil* 121: 71-79.
- Johnson L. F. 1957. Effect of antibiotics on the numbers of bacteria and fungi isolated from soil by the dilution-plate method. *Phytopathology* 47: 630-631.
- Johnson L. F., Mańka K. 1961. Modification of Warcup's soil plate method for isolating soil fungi. *Soil Science* 92: 79-83.
- Kadakal C., Artik N. 2008. Degradation kinetics of ergosterol in tomato paste serum. *European Food Research and Technology* 227: 683-688.
- Kwaśna H., Bateman G. L., Ward E. 2008. Determining species diversity of microfungi communities in forest tree roots by pure-culture isolation and DNA sequencing. *Applied Soil Ecology* 40: 44-56.
- Lau A. P., Lee S., Chan A. K. Y., Fang Ch. K. M. 2006. Ergosterol as a biomarker for the quantification of the fungal biomass in atmospheric aerosols. *Atmospheric Environment* 40: 249-259.
- Mańka K. 1964. Próby dalszego udoskonalenia zmodyfikowanej metody Warcupa izolowania grzybów z gleby. *Prace Komisji Nauk Rolniczych i Komisji Nauk Leśnych PTPN* 17 (1): 30-43.
- Mańka K. 1974. Zbiorowiska grzybów jako kryterium oceny wpływu środowiska na choroby roślin. *Zeszyty Problenowe Postępów Nauk Rolniczych* 160: 9-23.
- Marfleet L., Mağan N., Lacey J. 1991. The relationship between fungal biomass, ergosterol and grain spoilage. W: Fleurat-Lessard F., Ducom P. [red.]. *Proceedings of the 5th International Working Conference on Stored – Product Protection*. INRA, Bordeaux, France. 405-412.
- Martin J. P. 1950. Use of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method of estimating soil fungi. *Soil Science* 69: 215-232.
- Mille-Lindblom C., Wachenfeldt E., Tranvik L. 2004. Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples after fungal death. *Journal of Microbiological Methods* 59: 253-262.
- Montgomery H. J., Monreal C. M., Young J. C., Seifert K. A. 2000. Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 1207-1217.
- Müller H. M., Schwadorf K. 1993. A survey of the natural occurrence of *Fusarium* toxins in wheat grown in a south-western area of Germany. *Mycopathologia* 121: 115-121.
- Newell S. Y. 1992. Estimating fungal biomass and productivity in decomposing litter. W: Carroll G. C., Wicklow D. T. [red.]. *The Fungal Community: its organization and role in the ecosystem* (2nd ed.), Marcel Dekker. 521-561.

- Newell S. Y. 1994. Total and free ergosterol in mycelia of saltmarsh ascomycetes with access to whole leaves or aqueous of leaves. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 3479-3482.
- Newell S. Y., Miller J. D., Fallon R. D. 1987. Ergosterol content of salt marsh fungi: effect of growth conditions and mycelial age. *Mycologia* 79: 688-695.
- Nielsen K. F., Madsen J. O. 2000. Determination of ergosterol on mouldy building materials using isotope dilution and gas-chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 898: 227-234.
- Ohtonen R., Vare H. 1998. Vegetation composition determines microbial activities in a boreal forest soil. *Microbial Ecology* 36: 328-335.
- Perkowski J., Buško M., Stuper K., Kostecki M., Matysiak A., Szwajkowska-Michałek L. 2008. Concentration of ergosterol in small-grained naturally contaminated and inoculated cereals. *Biologia* 63: 542-547.
- de Ridder-Duine A. S., Smant W., van de Wal A., van Veen J. A., de Boer W. 2006. Evaluation of a simple, non-alkaline extraction protocol to quantify soil ergosterol. *Pedobiologia* 50: 293-300.
- Ruzicka S., Edgerton D., Norman M., Hill T. 2000. The utility of ergosterol as a bioindicator of fungi in temperate soils. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 989-1005.
- Salmonowicz B., Nylund J. E. 1988. High performance liquid chromatography determination of ergosterol as a measure of ectomycorrhizal infection in Scots pine. *European Journal of Plant Pathology* 18: 291-298.
- Scheu S., Parkinson D. 1994. Changes in bacterial and fungal biomass C, bacterial and fungal biovolume and ergosterol content after drying, remoistening and incubation of different layers of cool temperate forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* 26: 1515-1525.
- Schnürer J. 1993. Comparison of methods for estimating the biomass of three food-borne fungi with different growth patterns. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 552-555.
- Schnürer J., Jonsson A. 1992. Ergosterol levels and mould colony units in Swedish grains of food and feed grade. *Acta Agriculturae Scandinavica* 13: 1-6.
- Seitz L. M., Mohr H. E., Burroughs R., Sauer D. B. 1977. Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. *Cereal Chemistry* 54: 1207-1217.
- Seitz L. M., Sauer D. B., Burroughs R., Mohr H. E., Hubbard J. D. 1979. Ergosterol as an indicator of fungal growth. *Phytopathology* 69: 1202-1203.
- Stahl P. D., Parkin T. B. 1996. Relationship of soil ergosterol concentration and fungal biomass. *Soil Biology and Biochemistry* 28 (7): 847-455.
- Sundberg B., Ekblad A., Nasholm T., Palmqvist K. 1999. Lichen respiration in relation to active time, temperature, nitrogen and ergosterol concentrations. *Functional Ecology* 13 (1): 119-125.
- Tothill I. E., Harris D., Magan N. 1992. The relationship between fungal growth and ergosterol content of wheat grain. *Mycological Research* 96 (11): 965-970.
- Wallander H., Massicotte H. B., Nylund J. E. 1997. Seasonal variation in protein, ergosterol and chitin in five morphotypes of *Pinus sylvestris* L. ectomycorrhizae in a mature Swedish forest. *Soil Biology and Biochemistry* 29: 45-53.
- Weete J. D. 1989. Structure and function of sterols in fungi. *Advertising in Journal of Lipid Research* 23: 115-167.
- West A. W., Grant W. D., Sparling G. P. 1987a. Use of ergosterol, diamminopimelic acid and glucosamine contents of soils to monitor changes in microbial populations. *Soil Biology and Biochemistry* 19: 607-612.
- West A. W., Sparling G. P., Grant W. D. 1987b. Relationships between mycelial and bacterial populations in stored, air-dried and glucose-amended arable and grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry* 19: 599-605.
- Zhao X. R., Lin Q., Brookes P. C. 2005. Does soil ergosterol concentration provide a reliable estimate of fungal biomass? *Soil Biology and Biochemistry* 37: 311-317.

SUMMARY

Determination of fungal biomass in soil using ergosterol content analysis

The presence of microorganisms in the substrate is detected with increasing frequency using chemical methods. They are based on the qualitative and quantitative analyses of compounds which these microorganisms contain. Ergosterol is the primary sterol of fungi [Newell 1992, Sundberg et al. 1999]. Determination of its contents for the determination of fungal biomass was applied for the first time by Seitz et al. [1977]. The content of ergosterol in soil inoculated with damping-off fungi in the 1st-9th week amounted to 0-966 µg/g. Higher content of ergosterol was observed at the level of 120.4 µg/g-966.0 µg/g in the 5th week. Higher average content of cfu was observed for *H. haematococca* and *T. cucumeris* (fig.). Ergosterol content was correlated with

the size of fungal populations expressed in the number of colony forming units in 1 g soil more frequently in not sterile soil. Pearson's correlation coefficient reached 0.744-0.946 for not sterile soil and 0.700-0.900 for sterile soil (tab.). The analysis of ergosterol content is a highly promising method to study mycelial biomass in soil. It is a good method to study the presence of fungi in soil and the response of fungi to cultivation measures, applied fertilizers and chemicals. A more stable content of ergosterol in not sterile soil means that the method may be more suitable for the analyses of balanced and less dynamic environments.